

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002年1月3日 (03.01.2002)

PCT

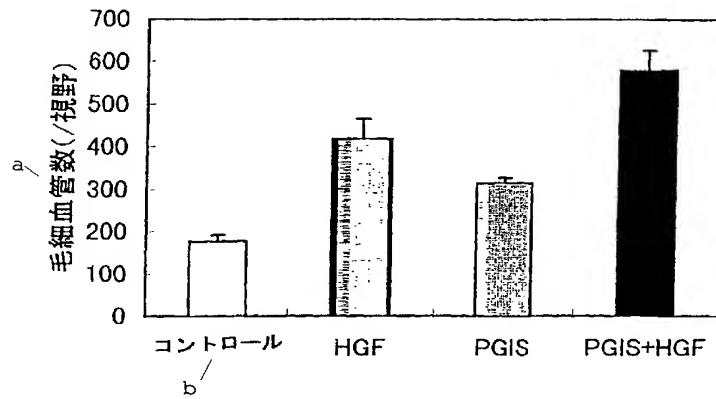
(10) 国際公開番号  
WO 02/00258 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 48/00,  
31/711, 38/18, 31/5585, A61P 9/00, 9/10
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05514
- (22) 国際出願日: 2001年6月27日 (27.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-192480 2000年6月27日 (27.06.2000) JP  
特願2000-388624 2000年12月21日 (21.12.2000) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): メドジーンバイオサイエンス株式会社(MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1丁目4番2号 千里ライフサイエンスセンター10階 Osaka (JP). 小池弘美(KOIKE, Hiromi) [JP/JP]; 〒567-0046 大阪府茨木市南春日丘7-8-3-303 Osaka (JP). 田邊 忠(TANABE, Tadashi) [JP/JP]; 〒560-0003 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号 Osaka (JP). 青木元邦(AOKI, Motokuni) [JP/JP]; 〒658-0081 兵庫県神戸市東灘区田中町1-11-25-203 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 森下竜一(MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS FOR ANGIOGENIC THERAPY

(54) 発明の名称: 血管新生療法用医薬組成物



a...CAPILLARY COUNT (/VISUAL FIELD)

b...CONTROL

A1

WO 02/00258

(57) Abstract: Medicinal compositions for angiogenic therapy which contain as the active ingredients at least one member selected from among substances having a vasodilating effect and/or a platelet aggregation inhibitory effect and substances producing the same, and a gene encoding an angiogenesis factor; agents for potentiating the angiogenic effect of a gene encoding an angiogenesis factor which contain as the active ingredient at least one member selected from among substances having a vasodilating effect and/or a platelet aggregation inhibitory effect and substances producing the same; an angiogenic agent which contains prostacyclin synthase gene as the active ingredient; medicinal compositions for angiogenic therapy which contain ets-1 gene and another gene encoding an angiogenesis factor as the active ingredients; an agent for potentiating the angiogenic effect of a gene encoding an angiogenesis factor which contain ets-1 gene as the active ingredient; and an angiogenic agent which contains ets-1 gene as the active ingredient.

[続葉有]



PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する血管新生療法用医薬組成物、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用の増強剤、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する血管新生剤、e t s - 1 遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを有効成分として含有する血管新生療法用医薬組成物、e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする他の遺伝子による血管新生作用の増強剤、並びに、e t s - 1 遺伝子を有効成分とする血管新生剤。

- 1 -

## 明細書

### 血管新生療法用医薬組成物

#### 技術分野

本発明は、血管新生療法のための新規な医薬組成物に関する。さらに詳しくは、本発明は、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法のための新規な医薬組成物に関する。本発明はまた、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子やets-1遺伝子の、血管新生療法への新規な適応などに関する。

#### 背景技術

新しい血管の発生や血管新生は親血管の内皮細胞の活性化と共に開始されるが、インビボでこの血管新生を刺激するだけでなく、インビトロで内皮細胞に対してマイトジェニックに作用することが示されている増殖因子を「血管新生因子（血管新生増殖因子）」と称している。

血管新生因子の治療的な適用は、Folkmanらによって最初に文献発表された（N Engl J Med. 285, 1182-1186(1971)）。またその後の研究によって、組換え血管新生因子、例えば纖維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリー（Science 257, 1401-1403(1992)、Nature 362, 844-846(1993)）、内皮細胞増殖因子（EGF）（J. Surg. Res. 54, 575-583(1993)）、及び血管内皮増殖因子（VEGF）などを使用して心筋及び下肢虚血症の動物モデルにおける側副血行路の発達を促進及び／又は増進させ得ることが確認されている（Circulation 90, II-228-II-234(1994)）。さらに本発明者らは、肝実質細胞増殖因子（HGF）がVEGFと同様に内皮特異的増殖因子として作用することを見出している（J. Hypertens. 14, 1067-1072(199

- 2 -

6))。

血管障害を治療するために前記の如き血管新生因子を用いる戦略は、「血管新生療法」と称されている。特に最近では、前記の如き血管新生因子の遺伝子を用いて、虚血性疾患や動脈疾患に対する血管新生療法の検討が積極的に進められている。

例えば本発明者らは、閉塞性動脈硬化症（ASO）に対する HGF 遺伝子の有効性を明らかにしている（Circulation, Vol.100, No.18, No.1672(1999)、Japanese Circulation Journal Vol.64, Suppl.I, p478, No.P079 (2000)）。また心筋梗塞における虚血再環流傷害に対して、HGF 遺伝子が有効に作用することが示されている（Circulation, Vol. 96, No. 8, No. 3459(1997)、Ann.Thorac.Surg., 67, p1726-1731(1999)、Gene Therapy, 7:417-427(2000)）。

また VEGF 遺伝子に関しては、ブタ心筋虚血モデルに対する VEGF 遺伝子の有効性（Human Gene Therapy 10:2953 (1999)）や、ウサギ下肢虚血モデルに対する有効性（Circulation 96(suppl II):II-382-388(1997)）が示されており、さらに、ASO 患者に対する効果（Circulation 97:1114-1123(1998)）や、狭心症患者に対する効果（Ann Thorac Surg 68:830-837 (1999)）も報告されている。現在米国では、Isner らのグループなどにより、ASO 患者や狭心症患者に対する VEGF 遺伝子治療の臨床試験が進められている状況にある。

さらに bFGF 遺伝子に関しては、筋ジストロフィーのモデルマウス mdx の筋肉内に bFGF 遺伝子を導入することにより、血管数の増加したことが報告されている（Gene Therapy 6(7):1210-1221(1999)）。

他方、プロスタグラミンの 1 種であるプロスタサイクリン（プロスタグラミン I<sub>2</sub>；PGI<sub>2</sub>）は、半減期 5～10 分の不安定な脂質メディエーターであり（Arch.Gynecol.Obstet., 243, p187-190(1988)）、G タンパク質共役型受容体を介して cAMP のレベルを増加させることにより、強力な血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を示すことが知られている（N Engl J Med. 17, p1142-1147(197

- 3 -

9))。そして、当該 PG I<sub>2</sub> や PG E<sub>1</sub> (プロスタグランジン E<sub>1</sub>)、及びこれらの誘導体 (アナログ) の如き血管拡張剤は、現在、種々の血管障害の治療に幅広く使用されている。すなわち、ASO や TAO (閉塞性血栓血管炎) などの末梢血行障害に対して、血管拡張作用、血小板凝集抑制作用などの作用を期待して、PG E<sub>1</sub> の動脈内投与や静脈内投与が行われており、確立した治療法となっている。また PG I<sub>2</sub> に関しては作用が強く失活もきわめて早いため、種々の誘導体 (イロプロストやベラプロストナトリウム等) が開発されており、これらは末梢血管閉塞性疾患や慢性動脈閉塞症の治療に使用されている (Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 54, 327-333(1996)、薬学雑誌、117, 509-521(1997))。さらに、膠原病による末梢循環障害、レイノー現象、体外循環の維持 (Minerva Med. 89, 405-409(1998)) や心不全 (Am. Heart J. 134, 44-54(1997)) などに対しても、これら PG E<sub>1</sub> や PG I<sub>2</sub> が使用されている。

以上のように、PG I<sub>2</sub> 等の血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を有する物質が、種々の血管障害に対して有効であることが知られている。しかしながら、前述の HGF 遺伝子等を用いた血管新生療法においてこれらの物質を組み合わせて用いたことは無く、どのような有効性が生ずるのかについては何ら明らかにされていない。

さらに、HGF や VEGF、bFGF、EGF 等の血管新生因子は、転写調節因子である et s - 1 (erythroblastosis virus oncogene homolog 1) の発現を亢進し、当該 et s - 1 を介して血管新生に関わる種々の因子を活性化することが知られている (J. Cell. Physiol., 169, 522-531(1996)、HGF の分子医学、メディカルレビュー社、179-185(1998))。しかしながら、当該 et s - 1 の遺伝子を血管新生療法に用いたことは無く、その効果については一切明らかにされていなかった。

本発明は、血管新生療法のための新規な医薬組成物を提供することを目的とする。さらに詳しくは、本発明は、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法のための新規な医薬組成物を提供することを目的とする。本発明はまた、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子、あるいはe t s - 1 遺伝子の、血管新生療法への新規な適応について提供することを目的とする。

本発明者らは、H G F 遺伝子を用いた血管新生療法において、P G I<sub>2</sub>を合成する酵素（P G I<sub>2</sub>合成酵素、以下、P G I Sと称する）の遺伝子を併用した場合に、どのような効果を示すのかにつき検討した。なお血管新生因子の遺伝子を用いた血管新生療法全般において、満足のいく併用効果を示した薬剤は今までには見出されておらず、さらに、他の遺伝子との併用効果なども明らかにされてはいなかった。

マウス下肢虚血 AS0 モデルを用いた検討の結果、H G F 遺伝子またはV E G F 遺伝子とP G I S 遺伝子を併用することにより、各遺伝子を単独で使用した場合と比較して予想外に顕著に、下肢血流を改善することが明らかとなった。さらに P G I S 遺伝子は、H G F 遺伝子またはV E G F 遺伝子による血管新生作用を増強し、また単独でも血管新生作用を有するということを、初めて見出した。

以上の結果により、血管新生因子の遺伝子を用いた血管新生療法において、P G I<sub>2</sub>の如き血管拡張作用や血小板凝集抑制作用を有する物質、あるいはP G I S 遺伝子の如き当該物質を生じさせる物質の併用は、極めて効果的であることが明らかとなった。

さらに本発明者らは、H G F やV E G F のシグナル伝達の下流に位置する転写調節因子 e t s - 1 をコードする遺伝子の、血管新生療法への適用についても検討した。その結果、転写調節因子である e t s - 1 遺伝子の単独投与によって、血管新生作用の認められることが初めて明らかとなった。また、e t s - 1 遺伝

子と HGF 遺伝子との併用により、各々単独で投与した場合と比較して、さらに顕著な血管新生作用の見られることが明らかとなった。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明の要旨は、

- (1) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (2) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (3) 血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (4) 血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (5) 血管新生因子が HGF 及び／又は VEGF である、前記 (1) ~ (4) いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (6) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質が cAMP の上昇に関与する物質である、前記 (1) ~ (5) いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (7) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質を生じせる物質が、遺伝子の形態であることを特徴とする、前記 (1) ~ (6) いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (8) 遺伝子がプロスタサイクリン合成酵素遺伝子である、前記 (7) 記載の血管新生療法用医薬組成物、

- 6 -

- (9) HGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (10) HGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (11) VEGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (12) VEGF遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (13) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(1)～(12)いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (14) 虚血性疾患又は動脈疾患が、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症、心筋症又は脳血管障害のいずれかである、前記(13)記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (15) 遺伝子を naked DNA の形態で導入することを特徴とする、前記(1)～(14)いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (16) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用の増強剤、
- (17) 血管拡張作用及び血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用の増強剤、
- (18) 血管新生因子がHGF及び／又はVEGFである、前記(16)又は(17)記載の血管新生作用の増強剤、
- (19) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質がcAMPの上昇に関与する物質である、前記(16)～(18)いずれか記載の血管新生作用の増強剤、

- 7 -

- (20) プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、前記(16)～(19)いずれか記載の血管新生作用の増強剤、
- (21) プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、HGF遺伝子による血管新生作用の増強剤、
- (22) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(16)～(21)いずれか記載の血管新生作用の増強剤、
- (23) プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、血管新生剤、
- (24) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(23)記載の血管新生剤、
- (25) *ets-1*遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (26) *ets-1*遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (27) 血管新生因子がHGF及び／又はVEGFである、前記(25)又は(26)記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (28) HGF遺伝子と*ets-1*遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物、
- (29) HGF遺伝子と*ets-1*遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物、
- (30) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(25)～(29)いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物、
- (31) *ets-1*遺伝子を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする他の遺伝子による血管新生作用の増強剤、
- (32) 血管新生因子がHGF及び／又はVEGFである、前記(31)記載の血管新生作用の増強剤、

- 8 -

(33) e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、HGF 遺伝子による血管新生作用の増強剤、

(34) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(31)～(33)いずれか記載の血管新生作用の増強剤、

(35) e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、血管新生剤、ならびに

(36) 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、前記(35)記載の血管新生剤、に関する。

本発明は、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物を提供するものである。

ここで血管新生療法において用いられる「血管新生因子をコードする遺伝子」とは、新たな血管の形成を誘導し得るタンパク質、ポリペプチド、あるいはこれらの一部分をコードする遺伝子を指す。具体的には、例えば HGF、VEGF、VEGF-2、酸性FGF(aFGF)、塩基性FGF(bFGF)、FGF-4、EGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、血小板由来内皮細胞増殖因子(PD-E CGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、腫瘍壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、インシュリン様増殖因子、アンジオポエチン-1などをコードする遺伝子が挙げられる。また、VEGFなどの遺伝子の発現を制御するHIF-1、あるいは e t s - 1 を含む e t s ファミリーなどの、転写因子をコードする遺伝子も挙げられる。好ましくは HGF 遺伝子及び VEGF 遺伝子が挙げられ、より好ましくは HGF 遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、公共のデータベースにその遺伝子配列が登録されており、当業者であれば、これらを利用することにより上記の遺伝子を容易にクローニングすることができる。

以下、HGF 遺伝子及び VEGF 遺伝子を例にとり説明する。

本発明において「HGF 遺伝子」とは、HGF(HGFタンパク)をコードす

る遺伝子を指す。また、当該HGF遺伝子を発現可能なように発現プラスミドに組み込んだものを、単に「HGF遺伝子」と称する場合もある。具体的には、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)などに記載のHGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター(非ウイルスベクター、ウイルスベクター)に組み込んだものが挙げられる。ここでHGFをコードするcDNAの塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質がHGFと実質的に同じ血管新生作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数(好ましくは数個)のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、などのうち、血管新生作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1)及び2)のDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

本発明において「VEGF遺伝子」とは、VEGFタンパクをコードする遺伝子を指す。また、当該VEGF遺伝子を発現可能なように発現プラスミドに組み込んだものを、単に「VEGF遺伝子」と称する場合もある。具体的には、VE

- 1 0 -

G F の c D N A を後述の如き適當な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが例示される。V E G F 遺伝子は、ヒトにおいては転写に際しての選択的スプライシングにより、4種類のサブタイプ( VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206)の存在が報告されている(Science, 219, 983(1983)、J.Clin.Invest., 84, 1470(1989)、Biochem.Biophys.Res.Commun., 161, 851(1989))。本発明においてはこれらのいずれのV E G F 遺伝子をも使用することが可能であるが、生物学的に最も活性が強いという観点から、VEGF165 遺伝子がより好ましい。さらに前記のH G F の場合と同様に、これらV E G F の遺伝子に対して改変等を施した遺伝子であっても、血管新生作用を有するタンパクをコードする遺伝子である限り、本発明のV E G F 遺伝子の範疇に含まれる。

当該V E G F 遺伝子もH G F 遺伝子と同様に、文献（例えば Science, 246, 1306(1989)）記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

以上のようなH G F 遺伝子やV E G F 遺伝子、あるいはこれらの改変体をコードする遺伝子が血管新生作用を有することは、例えば *in vitro*においては 国際公開第 97/07824 号公報に記載の血管内皮細胞に対する増殖効果を、また *in vivo*においては後述の実施例に記載のマウス下肢虚血モデルに対する血流改善効果を測定することなどにより、調べることができる。

以上のような血管新生因子をコードする遺伝子は、本発明の血管新生療法において単独で用いても良いし、又は複数を組み合わせて用いても良い。

ところで後述の実施例においては、H G F 遺伝子を用いた血管新生療法において、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子（P G I S 遺伝子）の併用が予想外に顕著な効果をもたらすことを初めて明らかにした。具体的には、H G F 遺伝子単独での効果 + P G I S 遺伝子単独での効果を越える、相乗的な効果のもたらされることを初めて明らかにした。

- 11 -

ここで、PGISにより合成されるPGI<sub>2</sub>は、前記のように血管拡張作用や血管透過性亢進作用、血小板凝集抑制作用を有するものである。従って前記相乗効果のもたらされた理由としては、HGF遺伝子とPGIS遺伝子とを併用することにより、PGI<sub>2</sub>の有する血管拡張作用や血小板凝集抑制作用などの効果を通して、虚血部位においてHGFが作用し易い、すなわちHGFが血管新生を行い易い環境がもたらされ、その結果、前記の如き予想以上の効果の生じたことが考えられる。

従って、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、あるいは当該物質を生じさせる物質であれば、PGIS遺伝子と同様の併用効果をもたらすことができると考えられる。よって本発明においては、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物を提供するものである。

特に、血管拡張作用と血小板凝集抑制作用の両方を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質が、本発明の血管新生療法において好適に用いられる。

ここで「血管拡張作用を有する物質」とは、公知の血管拡張作用を有する物質（市販の血管拡張剤等）の全てを含むものであり、遺伝子、タンパク質、低分子化合物等の如何なる物質であっても良い。具体的には以下のものが例示される。

すなわち一般的な血管拡張剤（いわゆる降圧剤）としては、Ca拮抗薬、ACE阻害薬、α1遮断薬、ANP（Atrial Natriuretic Peptide、心房性ナトリウム利尿ペプチド）、カリウムチャネルオーブナー、あるいはヒドララジン等が挙げられる。

特にASOで使用される血管拡張剤としては、例えばPGI<sub>2</sub>やPGE<sub>1</sub>、あるいはこれらの誘導体（イロプロスト、ベラプロストナトリウム、lip o PGE<sub>1</sub>等）といったプロスタグランジン製剤が挙げられる他、ニトログリセリンを含む亜硝酸化合物等のNOドナーまたは細胞内cGMP濃度を上昇させる薬剤、フ

- 1 2 -

オスフォジエステラーゼ阻害剤等の細胞内 cAMP を上昇させる薬剤などが挙げられる。

好ましくは cAMP を上昇させる薬剤、あるいはプロスタグラニン製剤が、より好ましくは PG<sub>I<sub>2</sub></sub>、PG<sub>E<sub>1</sub></sub>及びこれらの誘導体（アナログ）が、さらに好ましくは PG<sub>I<sub>2</sub></sub>誘導体が挙げられる。

また「血小板凝集抑制作用を有する物質」とは、公知の血小板凝集抑制作用を有する物質（市販の抗血小板剤等）の全てを含むものであり、遺伝子、タンパク質、低分子化合物等の如何なる物質であっても良い。具体的には、例えば前記 PG<sub>I<sub>2</sub></sub>や PG<sub>E<sub>1</sub></sub>、あるいはこれらの誘導体（イロプロスト、ベラプロストナトリウム、lipopG<sub>E<sub>1</sub></sub>等）といったプロスタグラニン製剤が挙げられる他、アラキドン酸代謝阻害剤、アデニレートシクラーゼ促進剤、ホスホジエステラーゼ III 阻害剤、5-HT<sub>2</sub>レセプター拮抗剤、アラキドン酸代謝阻害剤、あるいはホスホジエステラーゼ V 阻害剤等が挙げられる。

好ましくは cAMP を上昇させる薬剤、あるいはプロスタグラニン製剤が、より好ましくは PG<sub>I<sub>2</sub></sub>、PG<sub>E<sub>1</sub></sub>及びこれらの安定な誘導体（アナログ）が、さらに好ましくは PG<sub>I<sub>2</sub></sub>誘導体が挙げられる。

前記において「血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質を生じさせる物質」とはすなわち、前記血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質を合成、產生若しくは誘導する物質を意味する。具体的には、前記プロスタグラニンや cAMP を上昇させる物質を合成、產生若しくは誘導する物質を指す。

当該物質は遺伝子、タンパク質、低分子化合物等の如何なる物質であっても良いが、例えば血管拡張物質等を合成する合成酵素の場合は、遺伝子の形態で用いることが好ましい。当該遺伝子の具体例としては、例えば PGIS 遺伝子、シクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) 遺伝子、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 遺伝子 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89(16),7384-7388(1992))、NO 合成

- 1 3 -

酵素（内皮型・誘導型）遺伝子、チトクローム P450 遺伝子、ANP (Atrial Natriuretic Peptide) 遺伝子、BNP (Brain Natriuretic Peptide) 遺伝子、CNP (C-type Natriuretic Peptide) 遺伝子などが挙げられる。好ましくは PGIS 遺伝子、COX-1 遺伝子及び COX-2 遺伝子が、より好ましくは PGIS 遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、いずれも公共のデータベースにその遺伝子配列が登録されており、当業者であればこれらを利用することにより、容易にクローニングすることができる。

以下、PGIS 遺伝子を例にとり説明する。

本発明において「PGIS 遺伝子」とは、PGIS タンパクをコードする遺伝子を指す。また、当該 PGIS 遺伝子を発現可能なように発現プラスミドに組み込んだものを、単に「PGIS 遺伝子」と称する場合もある。具体的には、B.B.R.C., Vol.200, No.3, p1728-1734(1994)及び国際公開第 95/30013 号公報に記載の PGIS の cDNA を後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが例示される。さらに前記の HGF 遺伝子や VEGF 遺伝子の場合と同様に、これら PGIS の遺伝子に対して改変等を施した遺伝子であっても、PGIS としての作用を有するタンパクをコードする遺伝子である限り、本発明の PGIS 遺伝子の範疇に含まれる。

当該 PGIS 遺伝子も HGF 遺伝子や VEGF 遺伝子と同様に、前記文献記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。当該遺伝子によりコードされるタンパク質が所望の PGIS 活性を有することは、例えば、6-keto Prostaglandin F<sub>1</sub>  $\alpha$  enzyme immunoassay kit (Cayman 社製、カタログ番号 #515211)を用いたエンザイムイムノアッセイ、又はプロスタサイクリン合成酵素の代謝産物を薄層クロマトグラフィー (TLC) により検出する方法などにより、測定することができる。また後述の実施例に記載のマウス下肢虚血モデルに対する血管新生因子との併用効果を測定することにより、血管新生因

- 1 4 -

子による血管新生作用の増強効果を測定することができる。

以上のような血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、あるいは当該物質を生じさせる物質は、血管新生因子の遺伝子を用いた血管新生療法において、単独で用いても良いし、又は複数を組み合わせて用いても良い。

以下、本発明の血管新生療法用医薬組成物の導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

1) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質（遺伝子）と、血管新生因子をコードする遺伝子とを用いる場合

血管新生因子をコードする遺伝子と、前述の P G I S 遺伝子等の遺伝子を併用する場合、すなわち 2 種類以上の遺伝子を併用する場合は、共に遺伝子治療剤の形態をとる必要がある。代表的な組み合わせとしては、H G F 遺伝子と P G I S 遺伝子、あるいは V E G F 遺伝子と P G I S 遺伝子の組み合わせが挙げられる。

当該遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入 & 発現解析実験法、羊土社、1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

細胞への遺伝子導入法としては、リン酸ーカルシウム共沈法や、微小ガラス管を用いた D N A の直接注入法などが挙げられる。

また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム (internal type liposome) による遺伝子導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type lipos

- 1 5 -

ome) による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法 (HVJ-AVE リポソーム法) 、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体（金属粒子）とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等の何れかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。このうち naked-DNA の直接導入法が最も簡便であり、この観点から好ましい導入法である。また HVJ-リポソーム法は、従来のリポソーム法と比較して細胞膜との融合活性が非常に高いことから、好ましい導入形態である。なお HVJ としては Z 株 (ATCC より入手可能) が好ましいが、基本的にはその他の HVJ 株 (例えば ATCC VR-90 7、ATCC VR-105 など) も用いることができる。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば p CAGGS (Gene 108, 193-200(1991)) や、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoS V (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などが挙げられる。

前記 2 種類以上の遺伝子は、当該遺伝子を別々の発現ベクター中に組み込んで作製された 2 種類以上の組換え発現ベクターを、混合して同時に、又は時間的間隔をおいて別々に、生体内に導入することができる。また、1つの発現ベクター中に 2 種類以上の遺伝子を組み込んだ単一の発現ベクターを導入することも可能である。さらに、前記リポソーム系の製剤においては、2 種類以上の組換え発現ベクターを 1 つのリポソーム中に封入して導入することができれば、別々のリポソーム中に個々の組換え発現ベクターを封入し、これを導入することも可能である。

#### B. ウィルスベクターを用いる場合

ウィルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等が挙げられる。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウ

- 1 6 -

イルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルス又はRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

以上のようなアデノウイルスベクターに関しても、前述の非ウイルスベクターの場合と同様に、2種類以上の遺伝子が別々の発現ベクター中に組み込まれた組換え発現ベクターを混合して同時に、又は時間的間隔をおいて別々に、導入することができる。また、1つの発現ベクター中に2種類以上の遺伝子を組み込んだ単一の組換え発現ベクターを導入することも可能である。

さらに、前記非ウイルスベクター及びウイルスベクターの両方を用いて、2種類以上の遺伝子を生体内に導入することも可能である。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48、1994、実験医学増刊、12(1-5)、1994、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

*in vivo* 法により投与する場合は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内などに投与するか、又は病変の認められる組織そのものに直接局所投与することができる。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤など）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、

- 1 7 -

当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤（P B S等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、H V J-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができます。

また、疾患部位の周囲に遺伝子を存在し易くするために、徐放性の製剤（ミニペレット製剤等）を調製し患部近くに埋め込むことも可能であり、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。

前記2種類以上の組換え発現ベクターは、別々の製剤形態をとっても良く、また混合した合剤の製剤形態をとっても良い。

製剤中の遺伝子の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、各々の遺伝子として0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

2) 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質（低分子化合物、タンパク質等）と、血管新生因子をコードする遺伝子とを用いる場合

血管新生因子をコードする遺伝子と、低分子化合物やタンパク質、ペプチド等とを併用する場合、血管新生因子をコードする遺伝子については前述の遺伝子治療剤の形態とする。一方の低分子化合物等は、一般的な医薬組成物の形態とし、経口または非経口的に投与される。代表的な組み合わせとしては、HGF遺伝子とPGI<sub>2</sub>誘導体、VEGF遺伝子とPGI<sub>2</sub>誘導体の組み合わせなどが挙げられる。

以下、前記低分子化合物やタンパク質等を有効成分とする医薬組成物について説明する。

- 1 8 -

前記低分子化合物やタンパク質のうち、既に血管拡張剤や血小板凝集抑制剤（抗血小板剤）として市販されているものであれば、その能書に従い投与方法や投与量等を設定することができるが、一般的には以下のようない投与形態、投与方法が挙げられる。

すなわち、経口的に投与する場合、通常当分野で用いられる投与形態で投与することができる。非経口的に投与する場合には、局所投与剤（経皮剤等）、直腸投与剤、注射剤、経鼻剤等の投与形態で投与することができる。

経口剤又は直腸投与剤としては、例えばカプセル、錠剤、ピル、散剤、ドロップ、座剤、液剤等が挙げられる。注射剤としては、例えば無菌の溶液又は懸濁液、乳剤等が挙げられ、具体的には水、水-プロピレンジコール溶液、緩衝化液、0.4%の生理食塩水等が挙げられる。局所投与剤としては、例えばクリーム、軟膏、ローション、経皮剤等が挙げられる。

以上の剤形は通常当分野で行われている手法により、薬学的に許容される賦形剤、添加剤と共に製剤化される。薬学的に許容される賦形剤、添加剤としては、担体、結合剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤、pH調節剤、張度調節剤、浸潤剤等が挙げられる。また、薬学的に許容される担体としては、例えば炭酸マグネシウム、ラクトース、ペクチン、澱粉、メチルセルロース等が挙げられる。

このような医薬組成物は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適切な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内などに投与するか、又は病変の認められる組織そのものに直接局所投与することができる。また経口投与や坐薬としての投与も可能である。

投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、通常は成人に対し1日あたり約0.0001～約500mgの範囲、好ましくは約0.001～約100mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。

以上のような低分子化合物やタンパク質を有効成分とする医薬組成物は、血管

- 1 9 -

新生因子をコードする遺伝子を含有する遺伝子治療剤と同時に投与することもできれば、時間的間隔をおいて別々に投与することも可能である。

以上、本発明の血管新生療法用医薬組成物につき述べたが、当該医薬組成物は、血管新生療法が必要とされる全ての疾患に対して適用することができる。具体的には虚血性疾患又は動脈疾患が挙げられ、より具体的には、心疾患としては虚血性心疾患、心筋梗塞、急性心筋梗塞、心筋症、狭心症、不安定狭心症、冠動脈硬化、心不全などが挙げられ、また四肢虚血性疾患としては、閉塞性動脈硬化症（ASO）、バージャー病、血管損傷、動脈塞栓症、動脈血栓症、臓器動脈閉塞、動脈瘤などが挙げられる。またそれ以外としては脳血管障害が挙げられる。脳血管障害としては、具体的には脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症が挙げられる。本発明の医薬組成物は、これらの疾患のうち特に閉塞性動脈硬化症に対して有効に用いられる。

さらに本発明は、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも1種を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用の増強剤をも提供する。前述のように、本発明の血管新生療法用医薬組成物の有効成分である前記物質は、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用を増強する効果を有している。従って、前述のように血管新生療法用医薬組成物の一成分として使用される他、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用を高めるための増強剤として、単独でも使用することができる。本発明の増強剤は、血管新生因子をコードする遺伝子の効果が不十分な場合などに有効に使用される。なお本発明の増強剤は、1つの成分（物質）のみでも良く、また複数の成分（物質）を組み合わせて使用しても良い。

ここで本発明の増強剤の有効成分としては、具体的には前述のPGIS遺伝子やCOX遺伝子、さらにはPGI<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>あるいはこれらの誘導体などが挙

- 2 0 -

げられ、好ましくは P G I S 遺伝子が挙げられる。また、血管新生因子としては、前述のように H G F や V E G F が挙げられる。

本発明の増強剤の投与方法・投与形態、また適応疾患等は、前記血管新生療法用医薬組成物と同様である。

また本発明は、 P G I S 遺伝子を有効成分として含有する、血管新生剤をも提供する。すなわち本発明においては、 P G I S 遺伝子の単独投与により血管新生作用の生じることを初めて見出した。これは従来知られていなかった新規な作用であり、この知見により初めて、 P G I S 遺伝子が血管新生剤として用い得ることが明らかになったのである。本発明の血管新生剤は、前記と同様の血管新生を必要とする全ての疾患（虚血性疾患又は動脈疾患）に用いることができる。また投与方法・投与形態等は、前記の血管新生療法用医薬組成物と同様である。

さらに本発明においては、 e t s - 1 遺伝子が血管新生療法のための遺伝子治療剤として有効であることを初めて明らかにした。すなわち後述の実施例に示されるように、 e t s - 1 遺伝子の単独投与により血管新生作用の認められること、及び、 e t s - 1 遺伝子と H G F 遺伝子との併用により、各々単独で投与した場合と比較して、より血管新生の促進されることが明らかとなった。

ここで e t s - 1 とは、 H G F や V E G F 、 b F G F 、 E G F 等の血管新生因子の作用により共通に発現促進される転写調節因子であり、前記血管新生因子は e t s - 1 を介することにより、血管新生に関わる種々の因子を活性化することが知られている (J.Cell. Physiol., 169, 522-531(1996)、 HGF の分子医学, メディカルレビュー社、 179-185(1998) ) 。従って H G F 遺伝子のみならず、 V E G F 等の H G F 以外の血管新生因子遺伝子と当該 e t s - 1 遺伝子とを併用した場合にも、同様の併用効果が見られると考えられる。

従って本発明においては、 e t s - 1 遺伝子を単独、又は他の血管新生因子との併用に供することに係る、新規な血管新生療法用医薬組成物を提供するものであり、具体的には、以下の 3 つの形態を例示することができる。

- 2 1 -

- (1) e t s - 1 遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物。
- (2) e t s - 1 遺伝子を有効成分とする、血管新生因子をコードする他の遺伝子による血管新生作用の増強剤。
- (3) e t s - 1 遺伝子を有効成分とする、血管新生剤。

ここで「e t s - 1 遺伝子」とは、e t s - 1 (e t s - 1 タンパク) をコードする遺伝子を指す。また、当該 e t s - 1 遺伝子を発現可能なように発現プラスミドに組み込んだものを、単に「e t s - 1 遺伝子」と称する場合もある。具体的には、GenBank Acc.No.J04101 に登録されており、また Proc.Natl.Acad.Sc.i.U.S.A., 85(21), 7862-7866(1988)に記載のヒト ets-1 の cDNA を、前述のような遺伝子治療用の適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが挙げられる。当該 e t s - 1 遺伝子は、前述の H G F 遺伝子や V E G F 遺伝子と同様の手法によりクローニングすることができる。また、本発明の e t s - 1 遺伝子は天然型に限定されず、発現されるタンパク質が e t s - 1 と実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明の e t s - 1 遺伝子の範疇に含まれる。

このような e t s - 1 遺伝子は、前述の H G F 遺伝子や P G I S 遺伝子と同様の遺伝子治療剤の形態とされる。また、その生体内への導入方法や導入量、製剤形態等も、前記 H G F 遺伝子や P G I S 遺伝子と同様とされる。

前述の (1) のように、e t s - 1 遺伝子と血管新生因子をコードする他の (e t s - 1 以外の) 遺伝子とを併用する場合、これら 2 種類以上の遺伝子は、以下のような投与形態とされる。すなわち非ウイルスベクターを用いる場合は、別々の発現ベクター中に組み込んで作製された個々の組換え発現ベクターを、混合して同時に、又は時間的間隔をおいて別々に、生体内に導入することができる。また、1 つの発現ベクター中に 2 種類以上の遺伝子を組み込んだ单一の発現ベクターを導入することも可能である。さらに、投与形態としてリポソーム系の

- 2 2 -

製剤においては、前記個々の組換え発現ベクターを1つのリポソーム中に封入して導入することもできれば、別々のリポソーム中に個々の組換え発現ベクターを封入し、これを導入することも可能である。

一方、ウイルスベクターを用いる場合も、前記の非ウイルスベクターの場合と同様に、2種類以上の遺伝子が別々の発現ベクター中に組み込まれた組換え発現ベクターを混合して同時に、又は時間的間隔をおいて別々に、導入することができる。また、1つの発現ベクター中に2種類以上の遺伝子を組み込んだ単一の組換え発現ベクターを導入することも可能である。

さらに、非ウイルスベクター及びウイルスベクターの両方を用いて、前記2種類以上の遺伝子を生体内に導入することも可能である。

e t s - 1 遺伝子と併用される血管新生因子の遺伝子としては、前述のように、新たな血管の形成を誘導し得るタンパク質、ポリペプチド、あるいはこれらの一部分をコードする遺伝子であれば如何なるものであっても良いが、好ましくはHGF遺伝子及びVEGF遺伝子が挙げられ、より好ましくはHGF遺伝子が挙げられる。

また本発明のe t s - 1 遺伝子は、前述の(2)のように、HGFやVEGF等の血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用を増強するための増強剤として、単独で使用することもできる。このようなe t s - 1 遺伝子を有効成分とする増強剤は、血管新生因子をコードする遺伝子の効果が不十分な場合などに有効に使用される。特に、HGF遺伝子の作用を増強する増強剤として、有効に用いられる。さらに本発明のe t s - 1 遺伝子は、前述の(3)のように、血管新生剤として単独で使用することもできる。このようにe t s - 1 遺伝子を単独で使用する場合も、前記と同様の遺伝子治療剤としての投与方法、投与形態をとる。

以上のようなe t s - 1 遺伝子を用いた血管新生療法が適応される疾患としては、具体的には虚血性疾患又は動脈疾患が挙げられ、より具体的には、心疾患と

- 2 3 -

しては虚血性心疾患、心筋梗塞、急性心筋梗塞、心筋症、狭心症、不安定狭心症、冠動脈硬化、心不全などが挙げられ、また四肢虚血性疾患としては、閉塞性動脈硬化症（ASO）、バージャー病、血管損傷、動脈塞栓症、動脈血栓症、臓器動脈閉塞、動脈瘤などが挙げられる。またそれ以外としては脳血管障害が挙げられる。脳血管障害としては、具体的には脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症が挙げられる。本発明の *e t s - 1* 遺伝子を有効成分とする医薬組成物は、これらの疾患のうち特に閉塞性動脈硬化症に対して有効に用いられる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、マウス下肢虚血 ASO モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF 遺伝子、PGIS 遺伝子、HGF 遺伝子+PGIS 遺伝子）を投与した後、下肢血流をレーザードップラーイメージヤーを用いて測定し、左右の比の経時変化を調べた結果を示すグラフである。

図 2 は、マウス下肢虚血 ASO モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF 遺伝子、PGIS 遺伝子、HGF 遺伝子+PGIS 遺伝子）を投与した後、下肢血流をレーザードップラーイメージヤーを用いて測定し、遺伝子投与前に対する左右の比の増加率を経時的に調べた結果を示すグラフである。

図 3 は、マウス下肢虚血 ASO モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF 遺伝子、PGIS 遺伝子、HGF 遺伝子+PGIS 遺伝子）を投与した後、虚血肢筋肉内毛細血管数を調べた結果を示すグラフである。

図 4 は、ラット下肢虚血 ASO モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF 遺伝子、*ets-1* 遺伝子、HGF 遺伝子+*ets-1* 遺伝子）を投与した後、下肢血流をレーザードップラーイメージヤーを用いて測定し、左右の下肢血流比の増加率を調べた結果を示すグラフである。

- 2 4 -

図5は、ラット下肢虚血AS0モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF遺伝子、ets-1遺伝子、HGF遺伝子+ets-1遺伝子）を投与した後、虚血脉筋肉内毛細血管密度を測定した結果を示すグラフである。

図6は、ラット下肢虚血AS0モデルに対して各遺伝子（コントロール、HGF遺伝子、ets-1遺伝子、HGF遺伝子+ets-1遺伝子）を投与した後、虚血脉筋肉中のラットHGF濃度を調べた結果を示すグラフである。

図7は、ラット下肢虚血AS0モデルに対してets-1遺伝子を投与した後、虚血脉筋肉中のラットHGF濃度を調べた結果を示すグラフである。

図8は、マウス下肢虚血AS0モデルに対してPGIS遺伝子、VEGF遺伝子、または、VEGF遺伝子及びPGIS遺伝子を投与した後、虚血脉筋肉中のヒトVEGF濃度を調べた結果を示すグラフである。

図9は、マウス下肢虚血AS0モデルのための手術から10日後の未処理の右下肢(正常)、及び、左下肢(AS0)のLDIによる血流比を示すグラフである。

図10は、マウス下肢虚血AS0モデルに対して、PGIS遺伝子、VEGF遺伝子、または、VEGF遺伝子及びPGIS遺伝子を投与した2週間後、虚血脉筋肉中のLDIによる血流量の増加率を調べた結果を示すグラフである。

図11は、マウス下肢虚血AS0モデルに対して、PGIS遺伝子、VEGF遺伝子、または、VEGF遺伝子及びPGIS遺伝子を投与した4週間後、虚血脉筋肉中のLDIによる血流量の増加率を調べた結果を示すグラフである。

図12は、マウス下肢虚血AS0モデルに対して、PGIS遺伝子及びHGF遺伝子、VEGF遺伝子、または、VEGF遺伝子及びPGIS遺伝子を投与した4週間後、虚血脉筋肉の凍結切片をアルカリホスファターゼ染色により染色した写真である。

図13は、マウス下肢虚血AS0モデルに対して、PGIS遺伝子、VEGF遺伝子、または、VEGF遺伝子及びPGIS遺伝子を投与した4週間後の毛細血管密度を調べた結果を示すグラフである。

- 2 5 -

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### [実施例 1]

##### マウス下肢虚血 ASO モデルに対する HGF 遺伝子、PGIS 遺伝子の投与効果

###### (1) 材料

ヒト HGF 遺伝子は、ヒト HGF の cDNA (特開平 5-111383 号公報に記載) を常法によりクローニングし、これをサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを有する発現プラスミド pcDNA3.1(+) (Invitrogen 社)に挿入したものを用いた。

ヒト PGIS 遺伝子は、ヒト PGIS の cDNA (B.B.R.C., Vol.200, No.3, p1728-1734 (1994)) を常法によりクローニングし、これを CMV エンハンサーと  $\beta$ -アクチンプロモーターを有する発現プラスミド pCAGGS(Gene 108,193-200(1991))に挿入したものを用いた。

###### (2) 方法

C57BL/6J 系マウス (8 週齢、雄) を用いた。10 倍希釈のネンブタールを 200  $\mu$ l 腹腔内投与し、追加が必要な場合はエーテルを吸入させることにより、マウスを麻酔した。その後左下肢の動脈を結紮して、マウス下肢虚血 ASO モデルを作製した。その 10 日後、Laser Doppler Imager (LDI、Moor Instruments Ltd 社製、MLDI5070) を用いて両下肢の血流を評価し、左右の比率を算出した。評価後、左下肢筋肉内に、上記 (1) の遺伝子を naked plasmid の形態で各々 500  $\mu$ g 投与した。群としては、何も投与しないコントロール群、HGF 遺伝子単独投与群、PGIS 遺伝子単独投与群、HGF 遺伝子および PGIS 遺伝子併用群の 4 群を設定した。遺伝子投与の 2 週間後、および 4 週間後にも LDI を用いて血流を評価し、比率を算出した。また、4 週間後に左下肢筋肉を摘出し、凍結切片作製後、アルカリフィオスファターゼ染色により筋肉内の毛細血管密度を測定した。なお有

- 2 6 -

意差検定は Fisher's PLSD 法により行った。

### (3) 結果

LDI により測定した左右下肢血流の比率の経時変化を図 1 に示した。また、遺伝子投与前の LDI 比率に対する増加率を図 2 に示した。PGIS 遺伝子の投与により 2 週間後の血流は改善されたが、4 週後ではコントロール群とほぼ同等であった。HGF 遺伝子の投与により 2、4 週間後の血流が改善された。また、PGIS 遺伝子と HGF 遺伝子を併用することにより、各遺伝子単独投与の場合と比較して予想外に顕著に、血流が改善された（2 週間後：コントロール：100%、HGF 遺伝子投与：132%、PGIS 遺伝子投与：125%、HGF 遺伝子+PGIS 遺伝子投与：177%、 $P<0.01$ ；4 週間後：コントロール：100%、HGF 遺伝子投与：150%、PGIS 遺伝子投与：104%、HGF 遺伝子+PGIS 遺伝子投与：166%、 $P<0.01$ ）。

遺伝子投与 4 週間後の筋肉内毛細血管密度を図 3 に示した。PGIS 遺伝子または、HGF 遺伝子投与により毛細血管密度が増加した。また、PGIS 遺伝子と HGF 遺伝子を併用することにより、各遺伝子単独よりも顕著に毛細血管密度が増加した。

### [実施例 2]

#### ラット下肢虚血 ASO モデルに対する HGF 遺伝子、ets-1 遺伝子の投与効果

##### (1) 材料

ヒト HGF 遺伝子を有する発現プラスミドは、実施例 1 と同様のものを用いた。また、ヒト ets-1 遺伝子に関しては、ヒト ets-1 の cDNA (GenBank Acc.No.J04101, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85(21), 7862-7866(1988)) を常法によりクローニングし、これを市販の発現ベクターに挿入したものを用いた。

##### (2) 方法

Sprague Dawley ラット（12 週齢、雄）を用いた。片側の大脛動脈を摘出し、ラット下肢虚血 ASO モデルを作製した。その 1 週間後、左下肢筋肉内に HVJ-liposome 法を用いて遺伝子を各  $100 \mu\text{g}$  投与した。群としては、ベクターのみのコ

- 27 -

ントロール群、HGF 遺伝子単独投与群、ets-1 遺伝子単独投与群、HGF 遺伝子および ets-1 遺伝子併用群の 4 群を設定した。遺伝子投与前と遺伝子投与 4 週間後に Laser Doppler Imager (LDI) を用いて、両下肢の血流を評価し、左右の血流比の増加率を算出した。また、左下肢筋肉を摘出し、凍結切片作製後、アルカリ フォスファターゼ染色により筋肉内の毛細血管密度を測定した。内因性 HGF の発現に対する遺伝子投与の影響を調べるために、虚血脉筋肉中のラット HGF 濃度を ELISA キット（特殊免疫研究所製）を用いて測定した。

### (3) 結果

ets-1 遺伝子の単独投与により、筋肉組織内の ets-1 binding 活性が上昇した。また、ets-1 遺伝子投与により、LDI を用いて測定した下肢血流比の増加率が上昇し（図 4）、筋肉内毛細血管密度が増加した（図 5）。すなわち、ets-1 遺伝子単独投与による血管新生効果と ASO モデルに対する有効性が示された。また、ets-1 遺伝子単独投与群では、虚血脉筋肉中の HGF 濃度が上昇しており（図 6 及び図 7）、ets-1 遺伝子投与の有効性のメカニズムの 1 つと考えられた。

ets-1 遺伝子を HGF 遺伝子と共に投与した群では、ets-1 遺伝子単独、HGF 遺伝子単独を投与した群よりも LDI 血流比の増加率が顕著に上昇し（図 4）、筋肉内毛細血管密度も有意に増加した（図 5）。すなわち、ets-1 遺伝子または HGF 遺伝子を単独で遺伝子導入するよりも、両遺伝子を共に遺伝子導入する方がより血管新生が促進され、より ASO に対して有効である事が示された。

ラット虚血脉筋肉中の内因性 HGF 濃度を測定したところ、HGF 遺伝子単独投与群よりも HGF 遺伝子と ets-1 遺伝子を併用した群でラット HGF 濃度が高かった（図 6）。HGF 遺伝子を単独で投与した場合よりも ets-1 遺伝子を共に投与した場合に、内因性 HGF の発現は促進されたことから、HGF が ets-1 の活性化を通じた auto-loop 型の調節機構を持っている事が示唆された。

### [実施例 3]

マウス下肢虚血 ASO モデルに対する VEGF 遺伝子、PGIS 遺伝子の投与効果

- 2 8 -

### ( 1 ) 材料

ヒト VEGF 遺伝子は、ヒト VEGF165 の cDNA (九州大学第 2 外科、米満先生より供与) を常法によりクローニングし、これを CMV エンハンサーと  $\beta$ -アクチンプロモーターを有する発現プラスミド pCAGGS(Gene 108,193-200(1991))の EcoRI サイトに挿入したものを用いた。

ヒト PGIS 遺伝子は、ヒト PGIS の cDNA (B.B.R.C., Vol.200, No.3, p1728-1734 (1994)) を常法によりクローニングし、これを CMV エンハンサーと  $\beta$ -アクチンプロモーターを有する発現プラスミド pCAGGS(Gene 108,193-200(1991))に挿入したものを用いた。

### ( 2 ) 方法

1. C57BL/6J 系マウス (8 週齢、雄) を用いた。10 倍希釈のネンブタールを  $200 \mu\text{l}$  腹腔内投与し、追加が必要な場合はエーテルを吸入させることにより、マウスを麻酔した。その後左下肢の動静脈を結紮して、マウス下肢虚血 ASO モデルを作製した。評価後、左下肢筋肉内に、上記 (1) の遺伝子を naked plasmid の形態で各々 1mg 投与した。群としては、何も投与しないコントロール群、VEGF 遺伝子単独投与群、PGIS 遺伝子単独投与群、VEGF 遺伝子および PGIS 遺伝子併用群の 4 群を設定した。各群には 4 匹の動物が含まれた。左脛骨筋に各プラスミドを投与後 5 日目に、虚血下肢筋肉中のヒト VEGF タンパク質の濃度を、AN'ALYZA Immunoassay System human VEGF キット(GENZYME)を用いて測定した。(図 8)

2. 上述の方法と同様な方法によりマウス下肢虚血 ASO モデルを作製した。その 10 日後、Laser Doppler Imager (LDI、Moor Instruments Ltd 社製、MLDI5070) を用いて両下肢の血流を評価し、左右の比率を算出した (図 9 ; 右足(正常)、左下肢(ASO))。その結果、左下肢において血流が正常な場合を 100% とした場合に、その約 30% まで血流量が減少していることが確認された。評価後、左下肢筋肉内に、上記 (1) の遺伝子を naked plasmid の形態で各々  $500 \mu\text{g}$  投与した。群としては、何も投与しないコントロール群、VEGF 遺伝子単独投与

- 2 9 -

群、PGIS 遺伝子単独投与群、VEGF 遺伝子および PGIS 遺伝子併用群の 4 群を設定した。遺伝子投与の 2 週間後、および 4 週間後にも LDI を用いて血流を評価し、その増加率を算出した。また、4 週間後に左下肢筋肉を摘出し、凍結切片作製後、アルカリリフォスファターゼ染色し（図 12）、筋肉内の毛細血管密度を測定した。なお有意差検定は、Fisher's PLSD 法により行った。

### （3）結果

1. 図 8 に示すように、虚血下肢筋肉中のヒト VEGF タンパク質の濃度は、コントロール、及び、PGIS 遺伝子のみを投与した場合には検出されず、VEGF 遺伝子のみを投与した場合よりも、VEGF 遺伝子及び PGIS 遺伝子と一緒に投与した場合により多く検出された。

2. LDI により測定した左下肢の血流の 2 週間後の増加率を図 10 に、そして 4 週間後の増加率を図 11 に示した。VEGF 遺伝子単独、並びに、VEGF 遺伝子及び PGIS 遺伝子の投与により 2 週間後の血流は改善されないが、4 週間後ではコントロール群と比べ VEGF 遺伝子単独、そして VEGF 遺伝子及び PGIS 遺伝子の投与により血流が改善された。PGIS 遺伝子と VEGF 遺伝子を併用することにより、各遺伝子単独投与の場合と比較して予想外に顕著に、血流が改善された（2 週間後：コントロール：100%、PGIS 遺伝子投与：105%、VEGF 遺伝子投与：117%、VEGF 遺伝子+PGIS 遺伝子投与：115%；4 週間後：コントロール：100%、PGIS 遺伝子投与：103%、VEGF 遺伝子投与：130%、VEGF 遺伝子+PGIS 遺伝子投与：169%、 $P < 0.01$ ）。

遺伝子投与 4 週間後の筋肉内毛細血管密度を図 13 に示した。VEGF 遺伝子投与により毛細血管密度が増加した。また、PGIS 遺伝子と VEGF 遺伝子を併用することにより、各遺伝子単独よりも顕著に毛細血管密度が増加した。（コントロール：100%、PGIS 遺伝子投与：175%、VEGF 遺伝子投与：221%、VEGF 遺伝子+PGIS 遺伝子投与：338%、 $P < 0.0001$ ）。

- 3 0 -

### 産業上の利用の可能性

本発明により、血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、新規でかつ有効性の高い、血管新生療法用医薬組成物を提供することができる。また本発明により、プロスタサイクリン合成酵素遺伝子や e t s - 1 遺伝子といった、従来は血管新生療法に用いられることが分かっていなかった遺伝子が、当該血管新生療法に適用できることを新たに見出したことにより、これらの遺伝子を有効成分とする血管新生療法用医薬組成物を提供することができる。

- 3 1 -

### 請求の範囲

1. 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物。
2. 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種と、血管新生因子をコードする遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物。
3. 血管新生因子が HGF 及び／又は VEGF である、請求項 1 又は 2 記載の血管新生療法用医薬組成物。
4. 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質を生じさせる物質が、遺伝子の形態であることを特徴とする、請求項 1～3 いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物。
5. 遺伝子がプロスタサイクリン合成酵素遺伝子である、請求項 4 記載の血管新生療法用医薬組成物。
6. HGF 遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物。
7. HGF 遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物。
8. VEGF 遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物。
9. VEGF 遺伝子とプロスタサイクリン合成酵素遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物。
10. 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 1～9 いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物。
11. 虚血性疾患又は動脈疾患が、閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞、狭心症、心

筋症又は脳血管障害のいずれかである、請求項 1 0 記載の血管新生療法用医薬組成物。

1 2 . 遺伝子を naked DNA の形態で導入することを特徴とする、請求項 1 ~ 1 1 いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物。

1 3 . 血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質より選ばれた少なくとも 1 種を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする遺伝子による血管新生作用の増強剤。

1 4 . 血管新生因子が H G F 及び／又は V E G F である、請求項 1 3 記載の血管新生作用の増強剤。

1 5 . プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、請求項 1 3 又は 1 4 記載の血管新生作用の増強剤。

1 6 . プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、 H G F 遺伝子による血管新生作用の増強剤。

1 7 . 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 1 3 ~ 1 6 いずれか記載の血管新生作用の増強剤。

1 8 . プロスタサイクリン合成酵素遺伝子を有効成分として含有する、血管新生剤。

1 9 . 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 1 8 記載の血管新生剤。

2 0 . e t s - 1 遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを有効成分として含有する、血管新生療法用医薬組成物。

2 1 . e t s - 1 遺伝子と血管新生因子をコードする他の遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物。

2 2 . 血管新生因子が H G F 及び／又は V E G F である、請求項 2 0 又は 2 1 記載の血管新生療法用医薬組成物。

2 3 . H G F 遺伝子と e t s - 1 遺伝子とを有効成分として含有する、血管新

- 3 3 -

生療法用医薬組成物。

2 4 . H G F 遺伝子と e t s - 1 遺伝子とを併用することを特徴とする、血管新生療法用医薬組成物。

2 5 . 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 2 0 ~ 2 4 いずれか記載の血管新生療法用医薬組成物。

2 6 . e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、血管新生因子をコードする他の遺伝子による血管新生作用の増強剤。

2 7 . 血管新生因子が H G F 及び／又は V E G F である、請求項 2 6 記載の血管新生作用の増強剤。

2 8 . e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、 H G F 遺伝子による血管新生作用の増強剤。

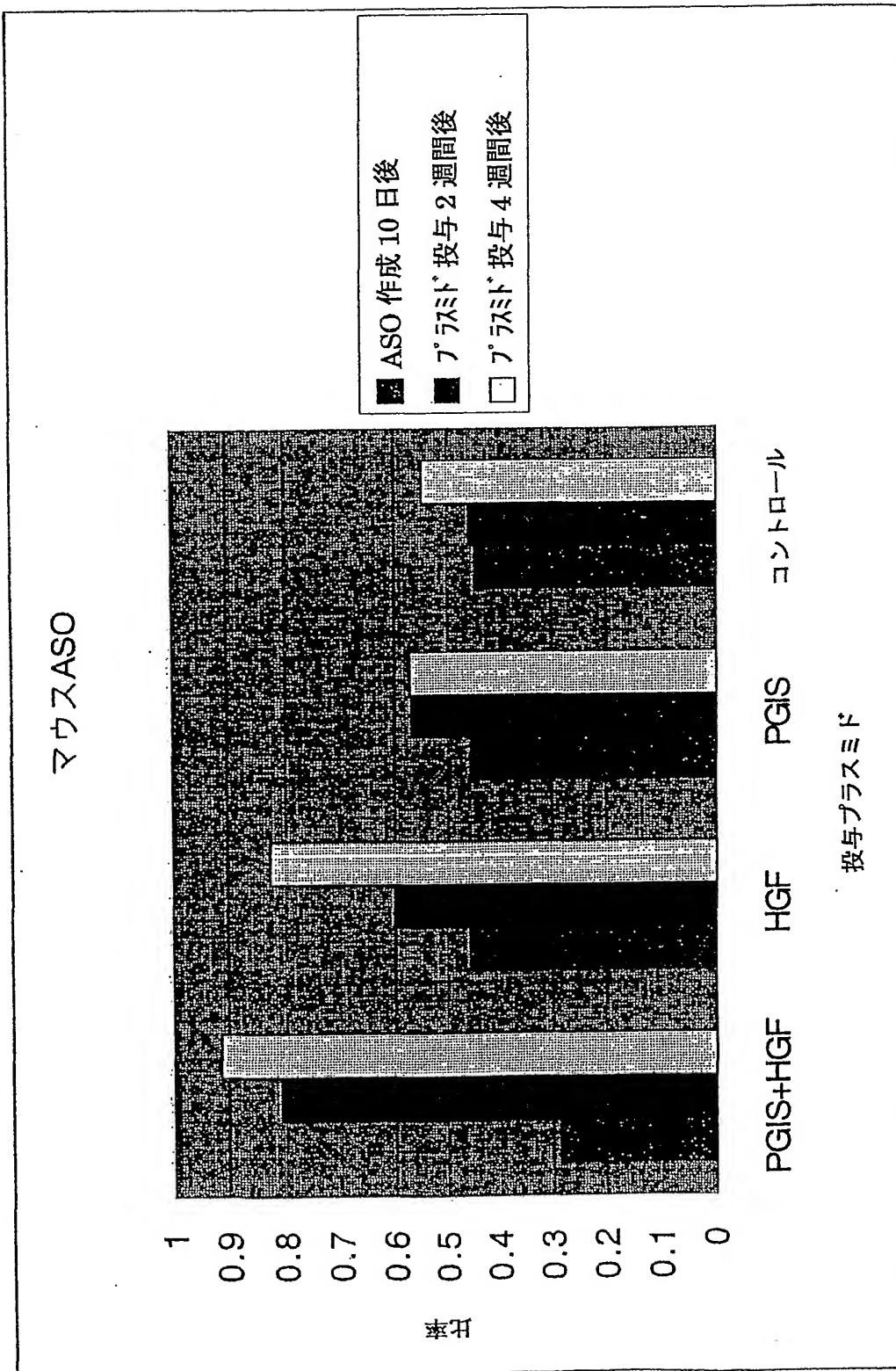
2 9 . 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 2 6 ~ 2 8 いずれか記載の血管新生作用の増強剤。

3 0 . e t s - 1 遺伝子を有効成分として含有する、血管新生剤。

3 1 . 虚血性疾患又は動脈疾患の治療又は予防に用いられる、請求項 3 0 記載の血管新生剤。

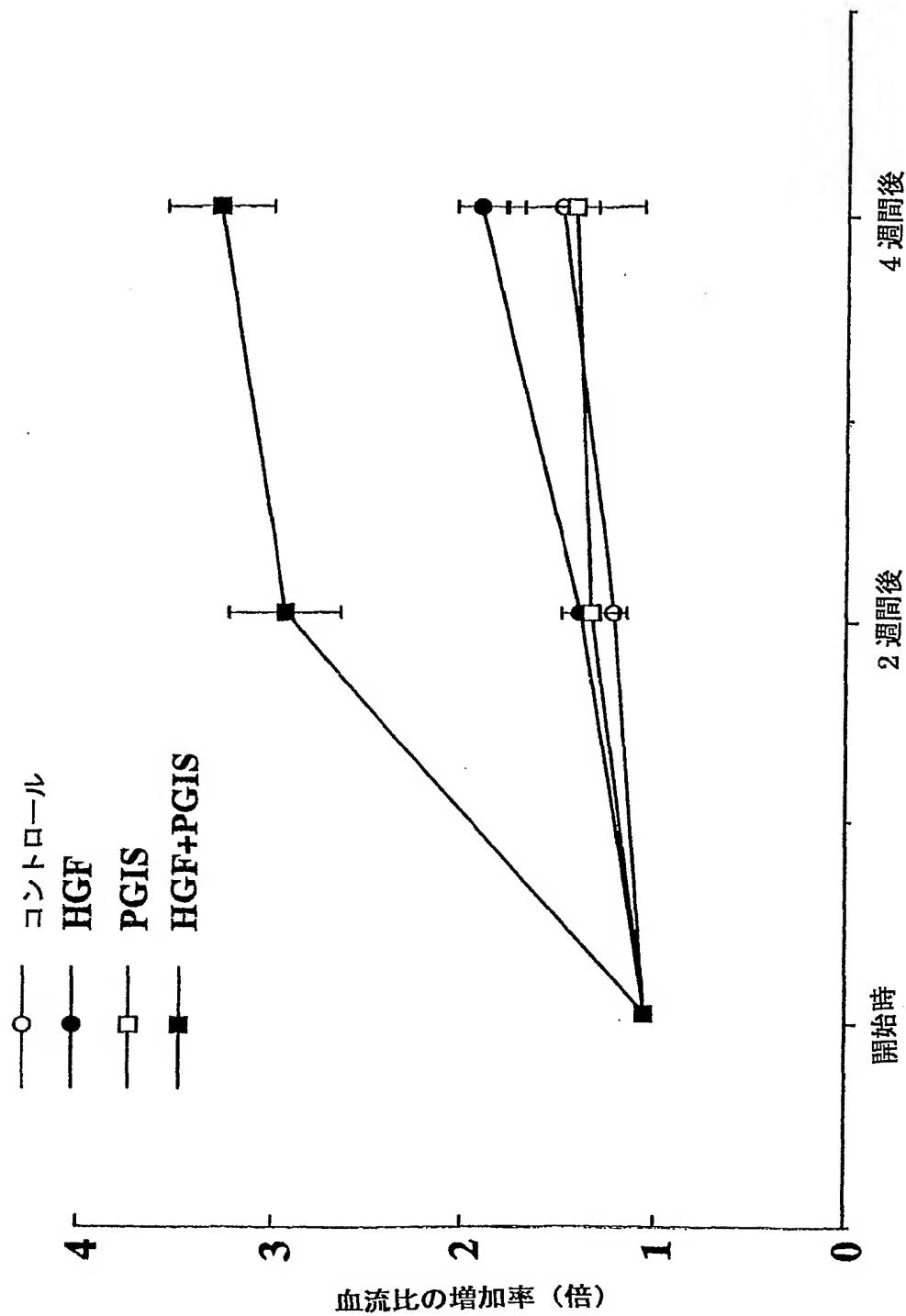
1 / 1 3

図 1



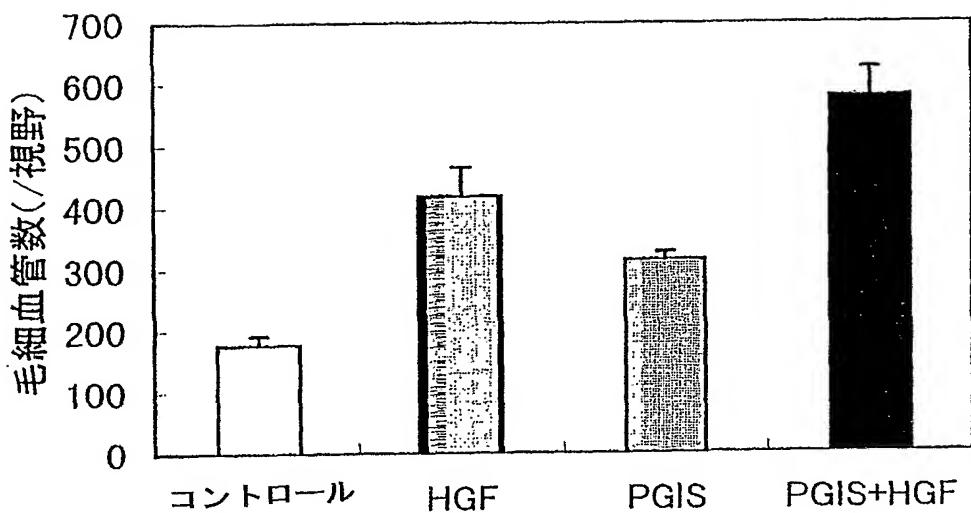
2 / 1 3

図 2



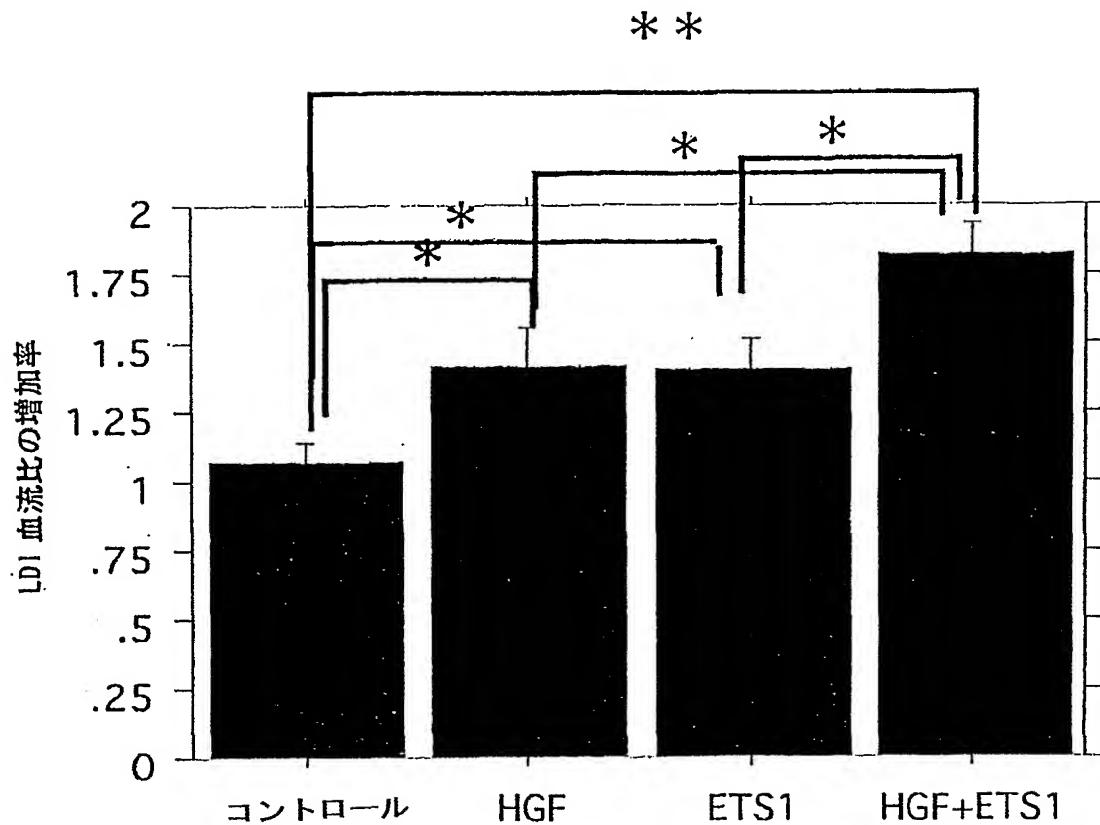
3 / 1 3

図 3



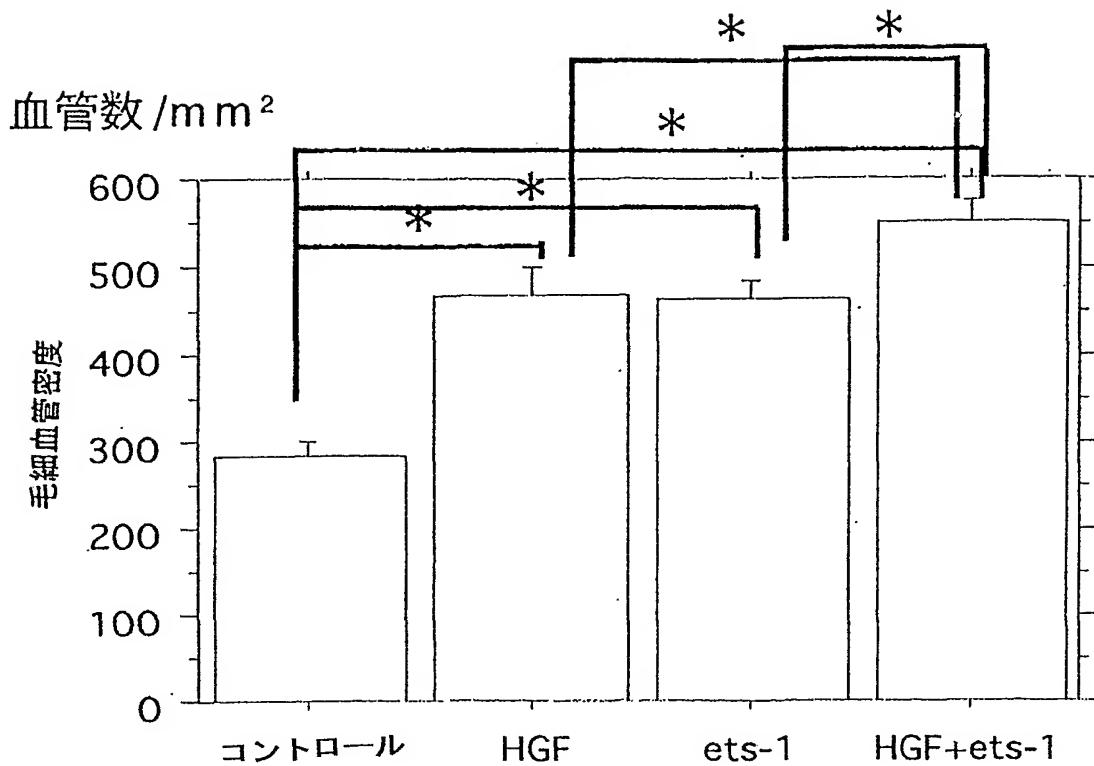
4 / 1 3

図 4



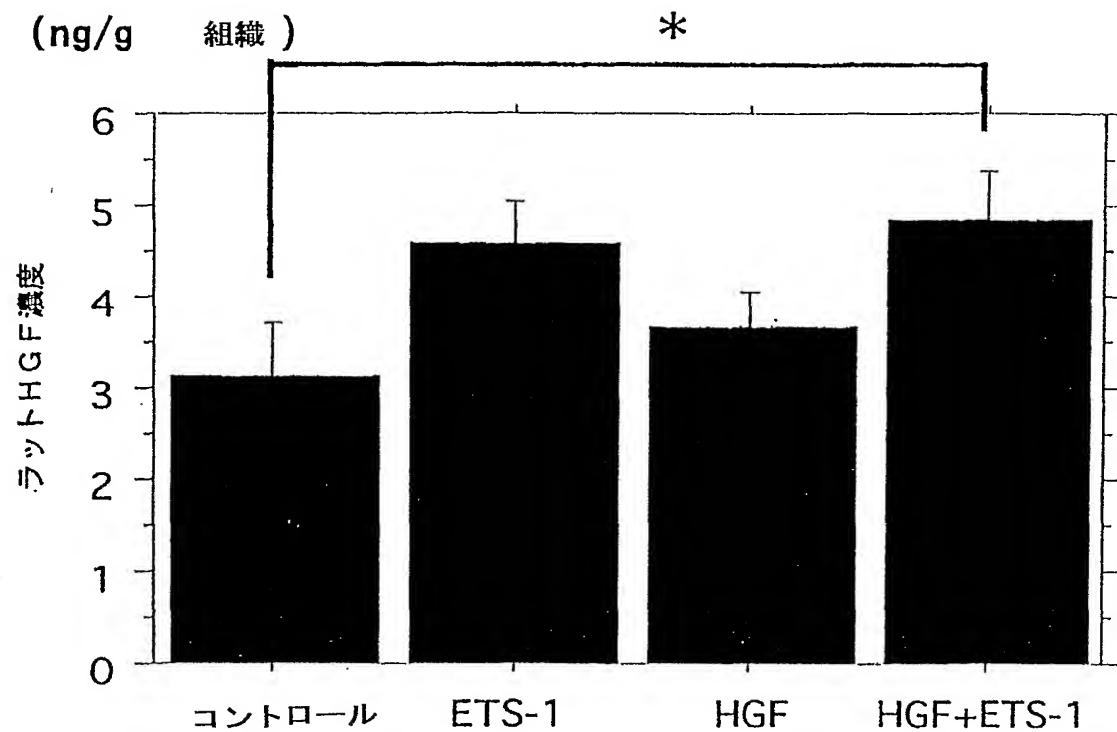
5 / 1 3

図 5



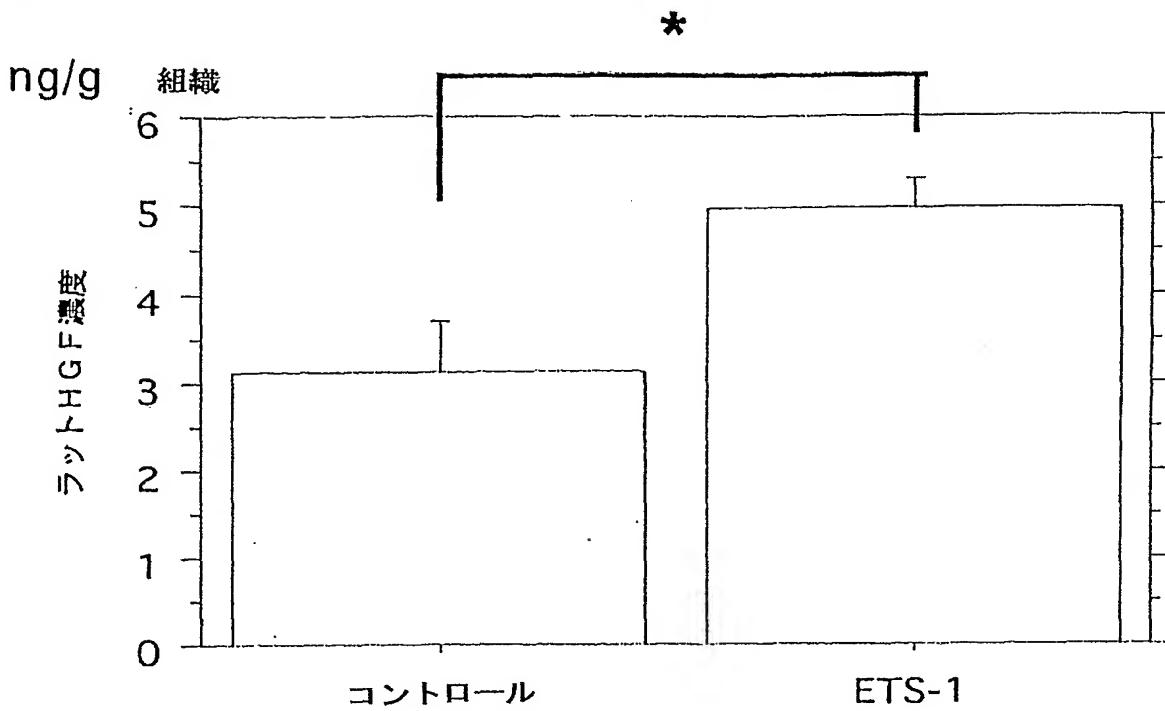
6 / 1 3

図 6



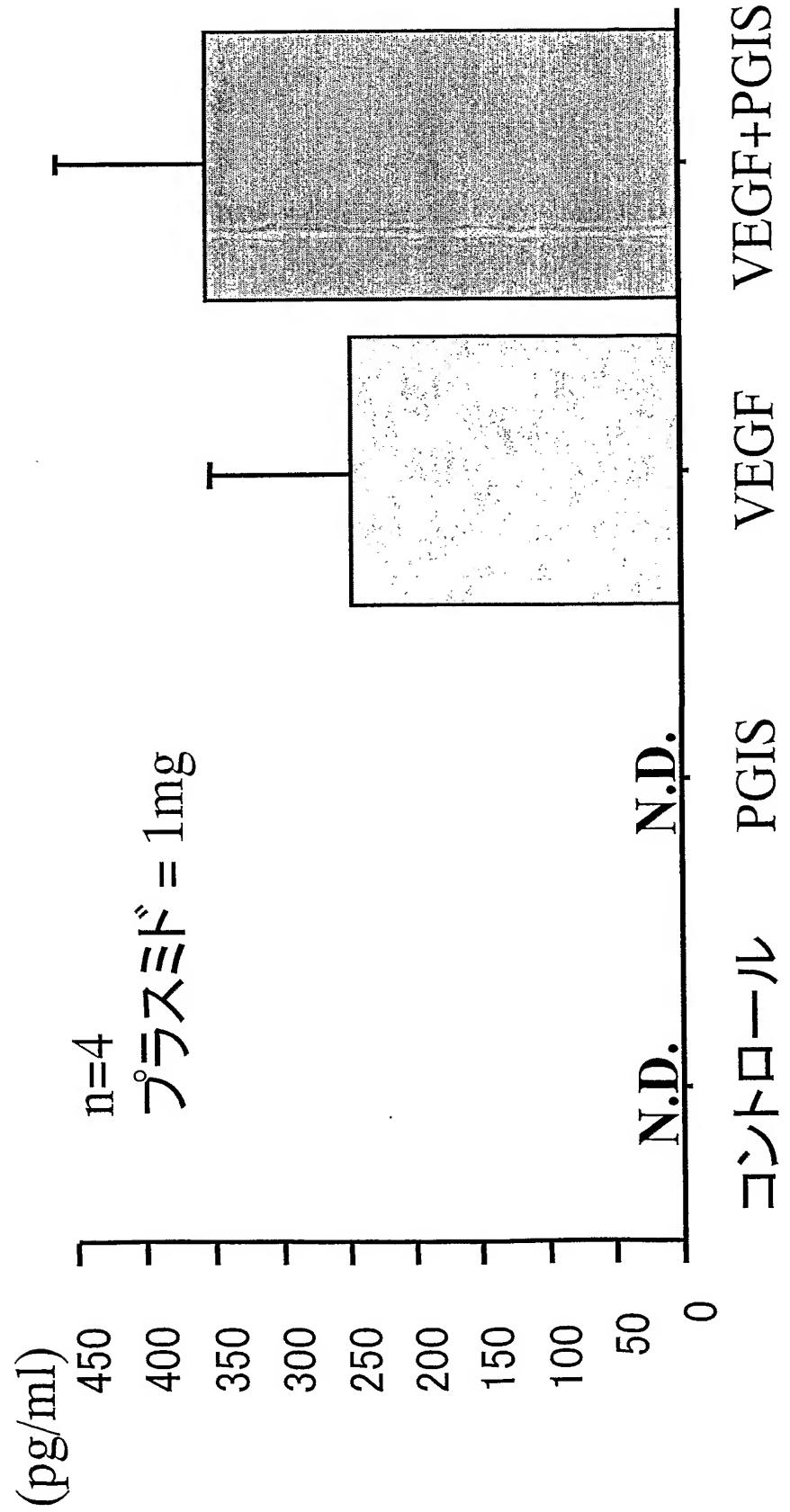
7 / 1 3

図 7



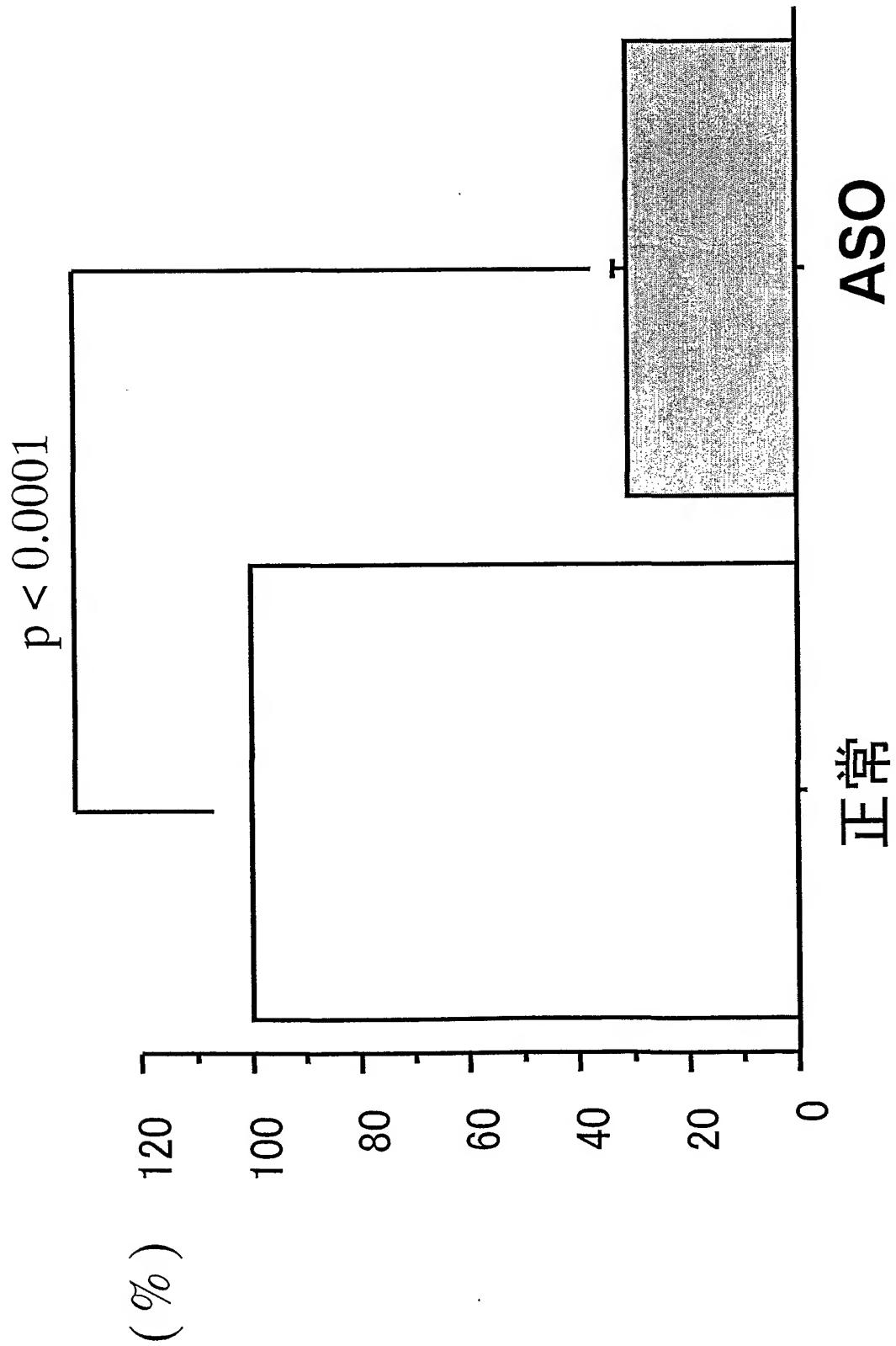
8 / 1 3

図 8



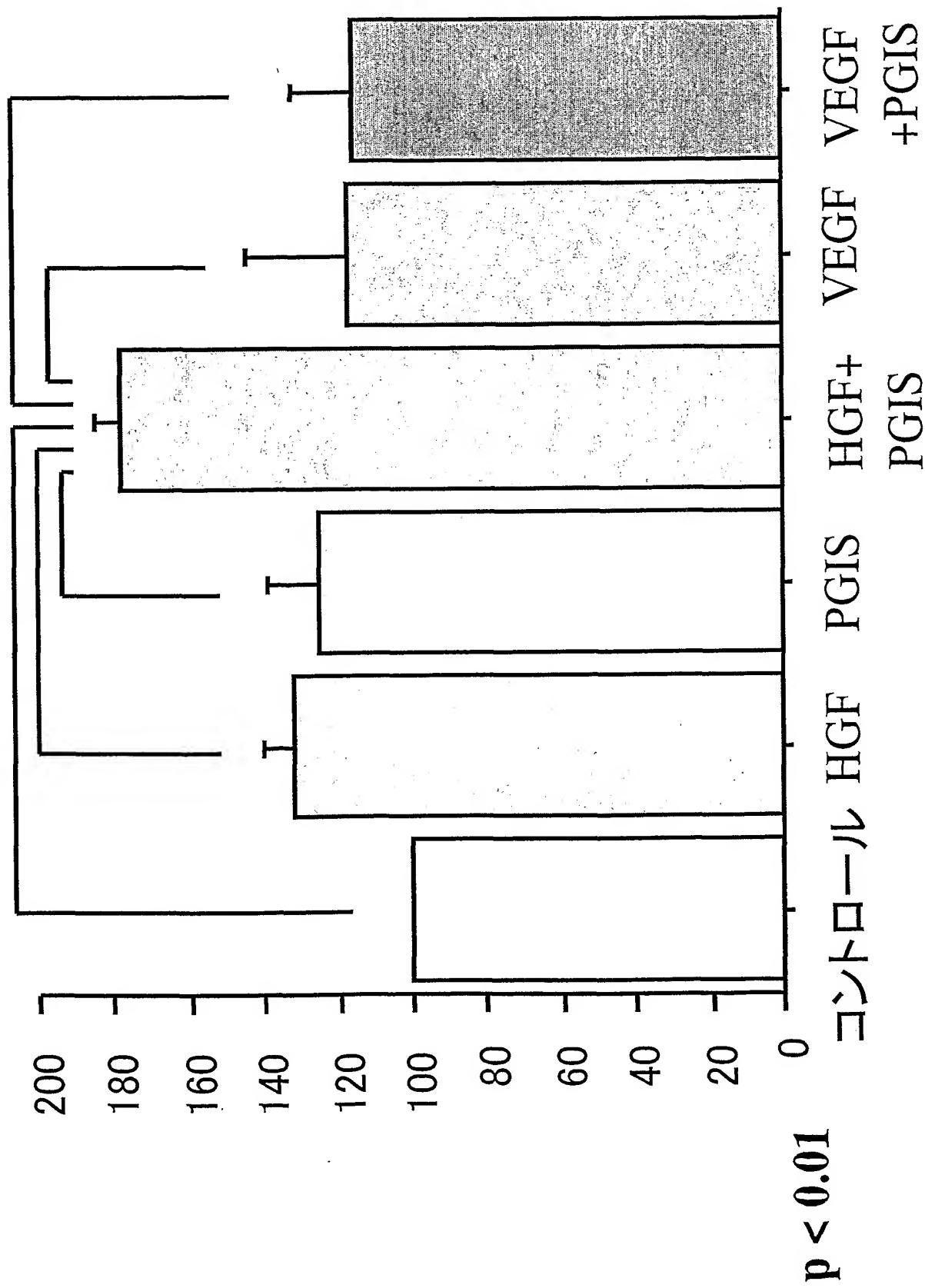
9 / 1 3

図 9



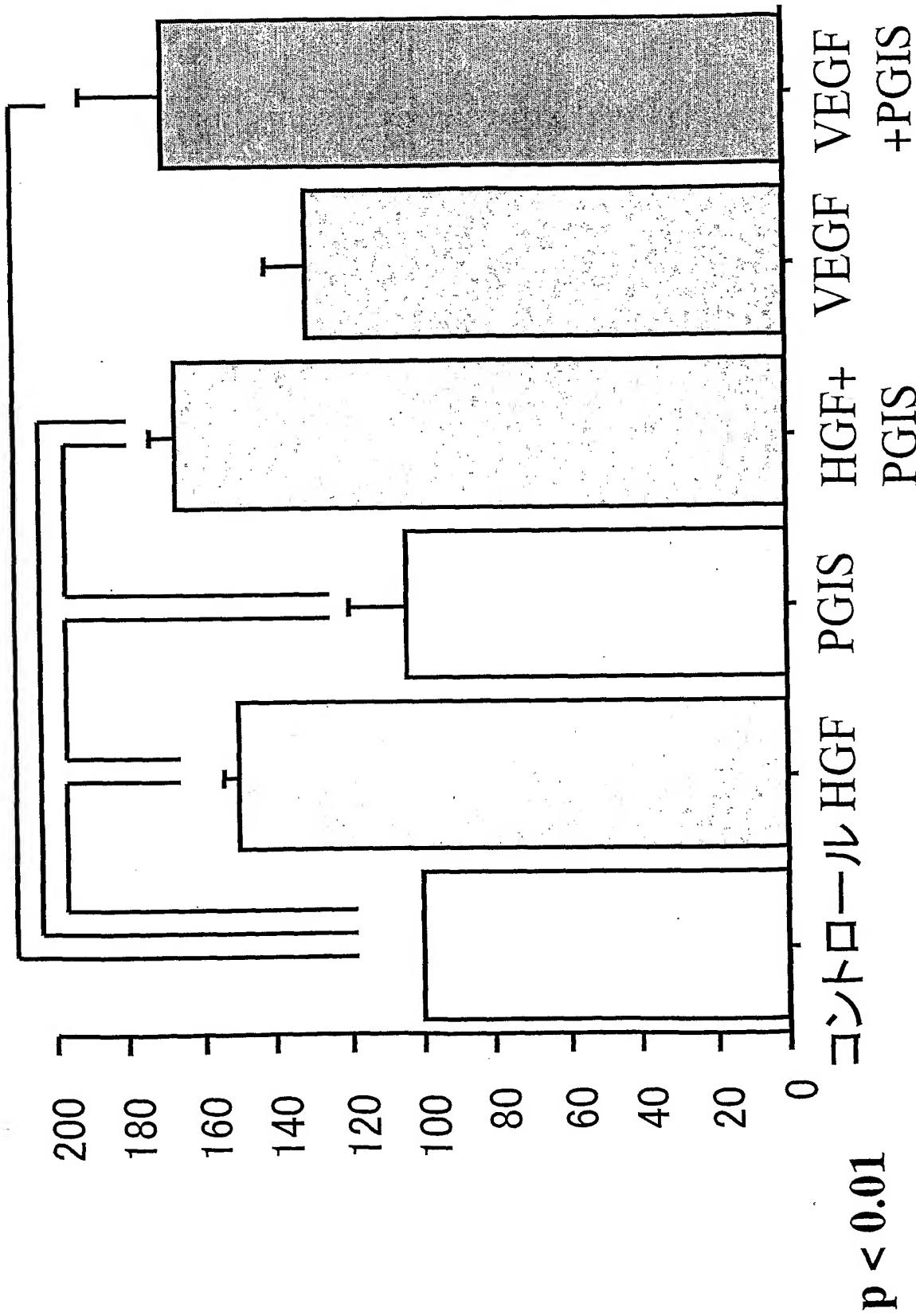
10 / 13

図 10



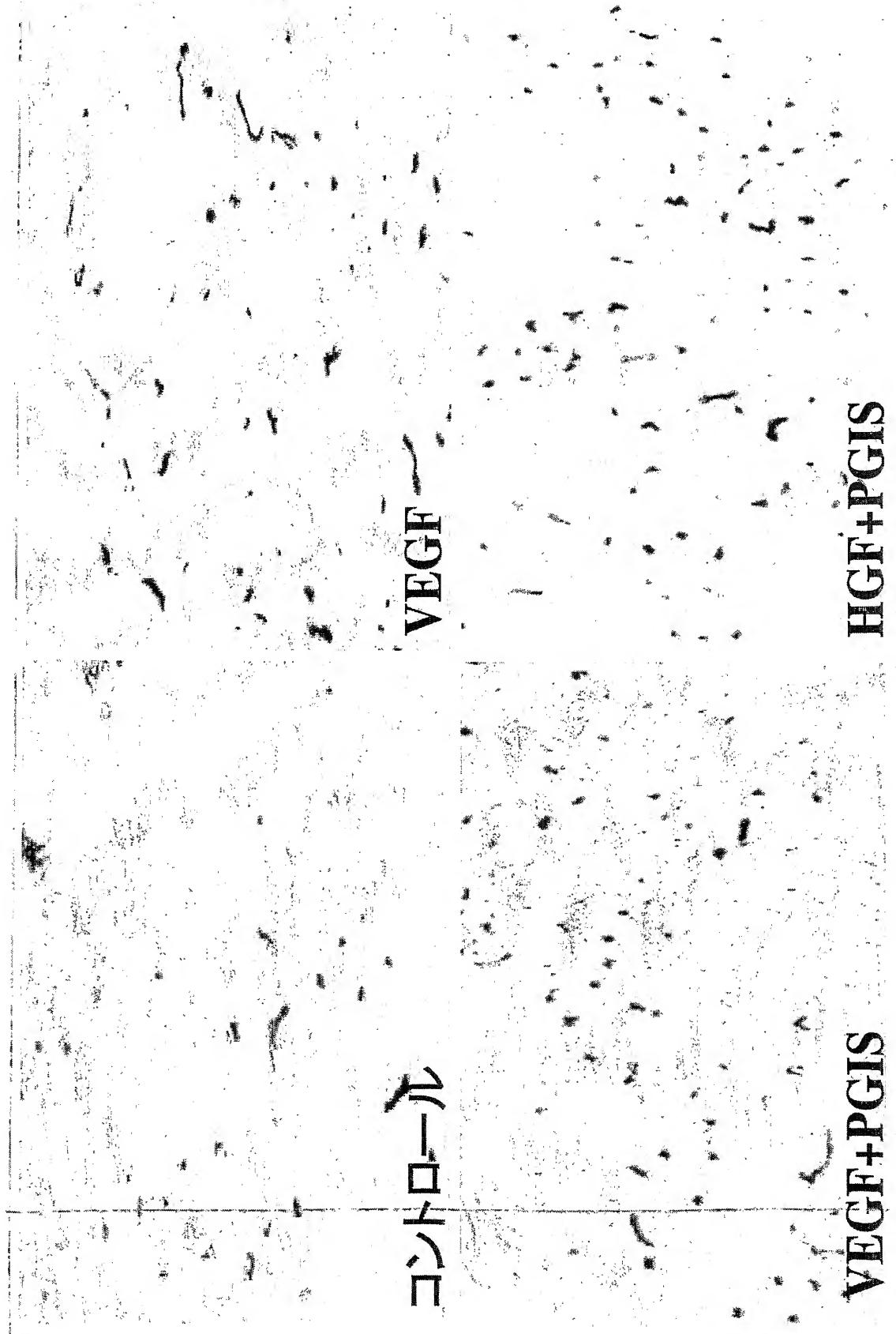
11 / 13

図 11



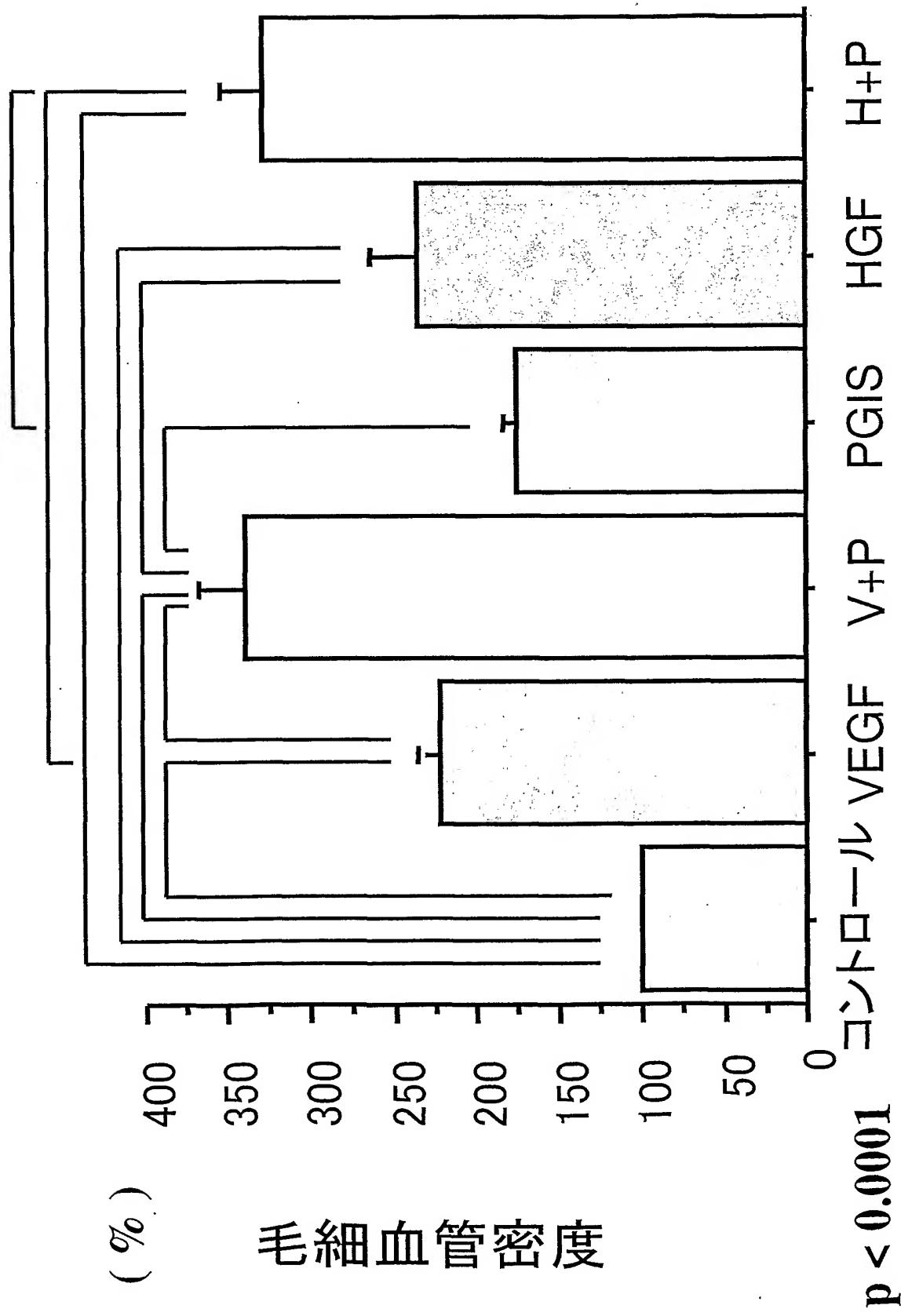
12 / 13

図 12



13 / 13

図 13



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05514

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 48/00, 31/711, 38/18, 31/5585, A61P9/00, 9/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 48/00, 31/70-31/711, 38/00-38/42, 31/557-31/5585, A61P9/00-9/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/14307 A1 (St. Elizabeth's Medical Center of Boston, Inc.), 24 April, 1997 (24.04.97), Claims; working example & JP 11-514366 A Claims; working example & EP 883343 A1 & US 6121246 A	1-19
Y	HE, H., et al., "Vascular Endothelial Growth Factor Signals Endothelial Cell Production of Nitric Oxide and Prostacyclin through Flk-1/KDR Activation of c-Src", J. Biol. Chem., (1999), Vol.274, No.35, pages 25130 and 25135, especially, abstract, page 25134	1-19
Y	JONES, M. K., et al. "Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing", Nat. Med., (1999), Vol.5, No.12, pages 1418 and 1423, especially, abstract, page 1422	1-3, 10, 11, 13, 14, 17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 July, 2001 (26.07.01)Date of mailing of the international search report  
25 September, 2001 (25.09.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/05514

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masahiko TSUJII, "COX to Kekkan Shinsei", Igaku no Ayumi, April, 2000, Vol.193, No.4, pages 245 to 248; Full text	1-3, 10, 11, 13, 14, 17
Y	EP 727490 A1 (Tadashi TANABE), 21 August, 1996 (21.08.96), Claims & WO 95/30013 A1 Claims & US 5814509 A	1-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/05514

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 19

Remark on Protest        The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
                                No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/05514

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

The inventions as set forth in claims 1 to 19 and claims 20 to 31 of the present case relate to medicinal compositions or drugs which are usable in angiogenic therapy. Since it had been publicly known to apply a gene encoding an angiogenesis factor, which is a matter described in common in these claims, to angiogenic therapy (see WO 97/14307 A1), it is recognized that the special technical feature in the inventions of the present case resides in combining this gene encoding an angiogenesis factor with other substance(s).

Since the "substances having a vasodilating effect and/or a platelet aggregation inhibitory effect and substances producing the same" described in claims 1 to 19 and the "ets-1 gene" described in claims 20 to 31 largely differ from each other in function, it is recognized that the inventions relating to the former and the inventions relating to the latter fail to satisfy the requirement of unity of invention.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A 61 K 45/00, 48/00, 31/711, 38/18, 31/5585,  
A 61 P 9/00, 9/10

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K45/00, 48/00, 31/70-31/711, 38/00-38/42, 31/557-31/5585, A61P9/00-9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), BIOTECHABS(STN), JICST(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 97/14307 A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 24. 4月. 1997 (24.04.97), 特許請求の範囲, 実施例, & JP 11-514366 A, 特許請求の範囲, 実施例, & EP 883343 A1, & US 6121246 A	1-19
Y	HE, H., et al. Vascular Endothelial Growth Factor Signals Endothelial Cell Production of Nitric Oxide and Prostacyclin through Flk-1/KDR Activation of c-Src. J. Biol. Chem., 1999, Vol. 274, No. 35, pages 25130 and 25135, 特に要約, p. 25134参照	1-19

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 07. 01

国際調査報告の発送日

25.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

荒木 英則

4C 9736



電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JONES, M. K., et al. Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. Nat. Med., 1999, Vol. 5, No. 12, pages 1418 and 1423, 特に要約、p. 1422	1-3, 10, 11, 13, 14, 17
Y	辻井 正彦, COXと血管新生, 医学のあゆみ, 4月, 2000, Vol. 193, No. 4, pp. 245-248, 全文参照	1-3, 10, 11, 13, 14, 17
Y	E P 7 2 7 4 9 0 A 1 (TANABE, Tadashi) 21. 8月. 1996 (21. 08. 96), 特許請求の範囲, & WO 95/30013 A1, 特許請求の範囲, & US 5814509 A	1 - 1 9

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照のこと。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-19

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

○第II欄について

本願の請求の範囲1-19及び20-31に係る発明はいずれも血管新生療法に用いることのできる医薬組成物又は薬剤に関するものである。ここで、両者で共通に記載されているものである血管新生因子をコードする遺伝子について、これを血管新生療法へ適用することは公知の事項であるから(WO 97/14307 A1参照)、本願発明における特別の技術的特徴とは、かかる血管新生因子をコードする遺伝子と別の物質とを組み合わせるところにあるものと認められる。

そして、請求の範囲1-19に記載される「血管拡張作用及び／又は血小板凝集抑制作用を有する物質、及び当該物質を生じさせる物質」と、請求の範囲20-31に記載される、「ets-1遺伝子」とはその機能が大きく異なるものであるから、結果として前者に係る発明と後者に係る発明とは発明の单一性の要件を満たさないものであると認められる。